

Любякина П.Н., Тамбасова Д.П., Лежнева М.Д., Ковалева Е.Г.

## ФЕРМЕНТАТИВНОЕ РАЗЛОЖЕНИЕ ХИТОЗАНА ХИТОЗАНАЗОЙ, ИММОБИЛИЗОВАННОЙ НА ГАММА ОКСИДЕ АЛЮМИНИЯ

*Аннотация.* В данной статье проведена оценка каталитической активности хитозаназы в 4 циклах, иммобилизованной на поверхности порошкового  $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$  физического адсорбцией и ковалентным связыванием с помощью глутарового альдегида, в реакции гидролиза хитозана.

*Ключевые слова:* хитозаназа, иммобилизация хитозаназы, гидролиз хитозана, глюкозамин.

*Abstract.* In this paper, the catalytic activity of chitosanase in 4 cycles immobilized on the surface of powder  $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$  by physical adsorption and covalent binding with glutaraldehyde in the chitosan hydrolysis reaction was estimated.

*Keywords:* chitosanase, immobilization of chitosanase, hydrolysis of chitosan, glucosamine.

### Введение

Хитозан получают путем химического N-деацетилирования хитина, одного из самых распространенных возобновляемых полисахаридов. Он привлекает к себе большой интерес в связи с его потенциальным применением в медицине, промышленности и сельском хозяйстве. Хитозан и его предшественник хитин являются источниками промышленного производства ценных веществ, таких как глюкозамин и хитоолигосахариды. Они обладают отличительной биологической активностью и поэтому широко используются в медицинских целях. Хитозаназа является специфическим ферментом для деградации хитозана. Иммобилизованный фермент при использовании более предпочтителен, чем свободный фермент в растворе, благодаря возможности многократного использования гетерогенных катализаторов и отсутствию загрязнения продукта реакции ферментом. Ранее [1-4] были исследованы хитозаназы, иммобилизованные в агаровом геле, целлюлозе и др. носителях. Данные носители не обладают такими преимуществами как

Поэтому целью работы является проведение иммобилизации хитозаназы из *Streptomyces griseus* на мезопористом порошке  $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$  путем физической адсорбции и посредством ковалентного связывания с использованием глутарового альдегида, а также изучения каталитической активности иммобилизованного фермента при гидролитическом разложении хитозана.

## Материалы и методы эксперимента

### *Материалы*

Хитозаназа, полученная из *Streptomyces griseus* (ЕС 3.2.1.132), осуществляет эндогидролиз  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4)-гликозидных связей между остатками N-ацетил-D-глюкозамина и D-глюкозамина в частично деацетилированном хитозане.

Хитозан обладает степенью ацетилирования – 18 % и молекулярной масса по данным вискозиметрии 15000 Да.

Образец мезопористого порошка  $\gamma$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> со средним диаметром частиц 2,60 мкм и удельной поверхностью 204 м<sup>2</sup>/г был получен химическим осаждением нитрата алюминия гидроксидом аммиака. Полученный осадок отфильтровывался и промывался водой, сушился при 60 °С и прокаливался при 550 °С.

### *Приготовление раствора хитозаназы*

Для приготовления раствора хитозаназы для хранения в вials с лиофилизированным порошком хитозаназы стерильным шприцом вводится 300 мкл 50%-ного раствора глицерина, затем вносятся 700 мкл 0,1 %-ного раствора БСА.

Из 1 мл хитозаназы отбирается 23 мкл раствора и к нему добавляется 977 мкл 0,1 % раствора БСА.

### *Приготовление раствора хитозана*

0,2 г хитозана растворяется при перемешивании в 2 мл 3 %-ной уксусной кислоты, затем добавляется порциями по 1 мл при перемешивании 3 мл фосфатного буфера, 250 мкл уксусной ледяной кислоты и порциями по 1 мл 7 мл фосфатного буфера. Затем 3,5 мл 1 М раствором NaOH доводится до pH=5.

### *Иммобилизация хитозаназы на $\gamma$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>*

Хитозаназа была иммобилизована на порошковом  $\gamma$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> с помощью физической адсорбции и посредством ковалентного связывания с использованием глутарового альдегида.

Для иммобилизации посредством ковалентного связывания к 1,6 г  $\gamma$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> прибавляется 4 мл 4 %-ного раствора глутарового альдегида, перемешивается и выдерживается в течение 1 ч, отделяется надосадочная жидкость и промывается влажный порошок 3 раза дистиллированной водой объемом 4 мл, к влажному порошку  $\gamma$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> приливается 4 мл раствора хитозаназы, перемешивается, выдерживается в течение 1,5 ч, порошок промывается 3 раза дистиллированной водой объемом 4 мл.

Для иммобилизации физической адсорбцией к 1,6 г порошка  $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$  прибавляется 4 мл раствора хитозаназы, перемешивается и выдерживается в течение 1,5 ч, порошок промывается 3 раза дистиллированной водой объемом 4 мл.

#### *Гидролиз хитозана с помощью иммобилизованного хитозаназы*

К влажному порошку  $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$  с иммобилизованным хитозаназой прибавляется 1 мл раствора хитозана и выдерживается в течение 24 ч в сушильном шкафу при 37 °С.

### **Определение концентрации глюкозамина**

Реакция останавливается 4 мин кипячением на водяной бане.

1 мл гидролизата смешивается с 1 мл деионизированной воды и 1 мл ацетилацетона в градуированной пробирке на 10 мл. Нагревается в течение 20 мин на кипящей бане. После охлаждения, добавляется 5 мл этанола, затем 1 мл реагента Эрлиха и доводится до 10 мл этанолом. После инкубации в течение 10 мин на водяной бане при температуре 65–70 °С, раствор центрифугируется и измеряется оптическая плотность при 540 нм против контрольного раствора.

По градуировочной кривой определяется концентрация глюкозамина в гидролизате и рассчитывается степень конверсии ( $\alpha$ ) по формуле:

$$\alpha (\%) = \frac{n_{\text{глюкозамин}}}{n_{\text{хитозан}}} \cdot 100 ,$$

где  $n_{\text{глюкозамин}}$  – количество ммоль образовавшегося глюкозамина;

$n_{\text{хитозан}}$  – количество ммоль загруженного хитозана.

Определение операционной стабильности (R, %) иммобилизованного хитозаназы проводилось по формуле:

$$R (\%) = \frac{C_{\text{глюкозамина}}^{\text{п-ый цикл}}}{C_{\text{глюкозамин}}^{\text{1-ый цикл}}} ,$$

где  $C_{\text{глюкозамина}}^{\text{п-ый цикл}}$  и  $C_{\text{глюкозамин}}^{\text{1-ый цикл}}$  – концентрации глюкозамина в исследуемом гидролизате, мг/ мл, соответственно.

### **Результаты и обсуждение**

В результате работы было установлено, что наибольшей каталитической активностью обладает фермент хитозаназа, иммобилизованный на порошковом оксиде алюминия путем физической адсорбции, максимальная степень конверсии при данных условиях составила 1,84 % (табл. 1).

Таблица 3 – Каталитическая активность гетерогенного и гомогенного катализаторов на основе хитозаназы

	Адсорбция на $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$	Ковалентное связывание на $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$	Гомогенный катализ
Оптическая плотность гидролизата, D	0,30	0,11	0,43
Концентрация глюкозамина, мг/мл	0,29	0,105	0,41
Степень конверсии, $\alpha$ , %	2,0	0,8	5,8

При этом операционная стабильность во втором цикле достигает 71,43 % со снижением до 69,05 % в третьем цикле и стабилизацией в четвертом цикле (рис. 1.)

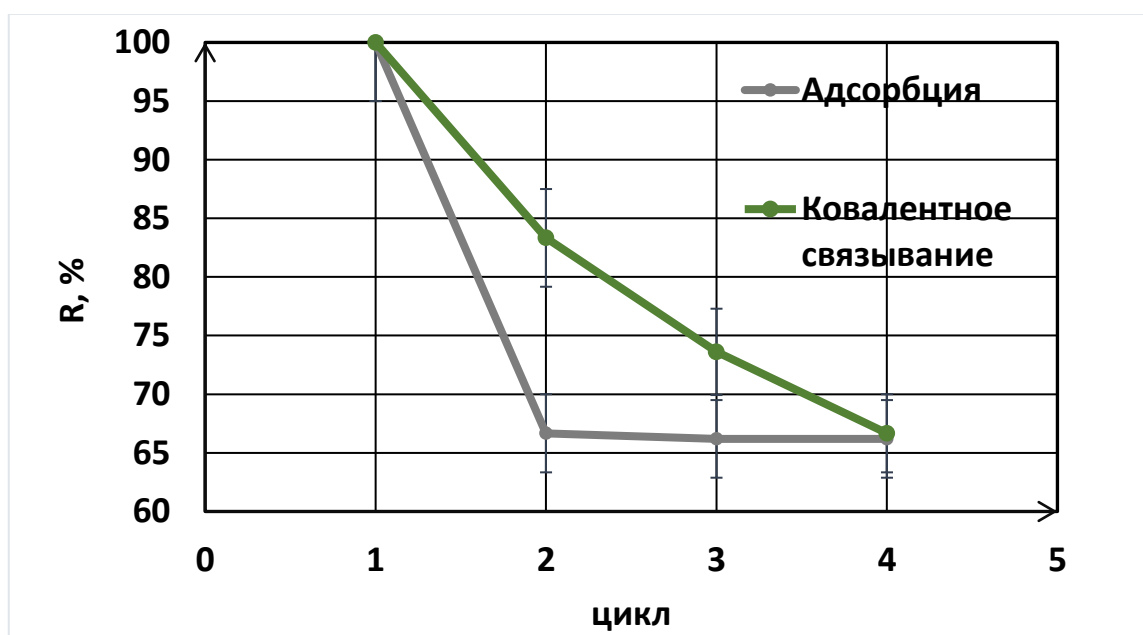


Рисунок 4 – Операционная стабильность R (%) хитозаназы в течение 4 циклов

### Заключение

В результате проделанной работы было установлено, что наибольшей каталитической активностью обладает фермент хитозаназа, иммобилизованная на порошковом оксиде алюминия путем физической адсорбции.

Результаты экспериментов по исследованию операционной стабильности хитозаназы показали, большей стабильностью обладает хитозаназа, иммобилизованный физической адсорбцией.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке грантами РФФИ № 17-03-00641 и Минобразования РФ в рамках базовой части государственного задания, проект №4.9514.2017/8.9.

#### ***Библиографический список***

1. Zheng L.-Y. Penicillium sp. ZD-Z1 Chitosanase Immobilized on DEAE Cellulose by Cross-linking Reaction / L.-Y. Zheng, Y.-L. Xiao // Korean Journal of Chemical Engineering. – 2004. – Vol. 21, 1 1. – P. 201–205.
2. Chitosanase immobilization using composite carrier of sodium alginate/cellulose / Y. Wang [et al.] // International Conference on Chemical Engineering and Advanced Materials. – 2011. – Vol. 236/238. – P. 2371–2377.
3. Immobilization and Stabilization of Chitosanase by Multipoint Attachment to Agar Gel Support / I. Sosaku [et al.] // Journal of bioscience and bioengineering. – 2002. – Vol. 93, 1. 3. – P. 201–206.
4. Production of chitosan oligosaccharides by chitosanase directly immobilized on an agar gel-coated multidisk impeller / M. Mei [et al.] // Biochemical Engineering Journal. – 2006. – Vol. 28, 1. 3. – P. 289–294.